

JP 2004/004355

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.3.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 1 6 6 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 1 6 6 3]

出 願 人 京 都 電 子 工 業 株 式 会 社
Applicant(s):

REC'D. 21 MAY 2004

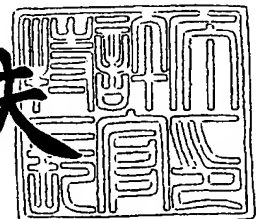
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 6 7 5 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 188226

【提出日】 平成15年 3月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/13

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町 6 8 京都電子工業株式会社内

 【氏名】 澤田石 一之

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町 6 8 京都電子工業株式会社内

 【氏名】 日向野 桂一

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町 6 8 京都電子工業株式会社内

 【氏名】 片岡 千和

【特許出願人】

 【識別番号】 000161932

 【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町 6 8

 【氏名又は名称】 京都電子工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100062144

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

 【識別番号】 100086405

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100083356

【弁理士】

【氏名又は名称】 柴田 康夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証（写） 2

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ダイオキシンを認識する組換抗体および該抗体をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-PeCDF)に結合活性を有する組換抗体であって、

(1) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2) 該モノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(3) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(4) 該モノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む組換抗体。

【請求項 2】 (5)のポリペプチドが、(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に98%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチドである請求項1に記載の組換抗体。

【請求項 3】 モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド、ならびに、モノクローナル

抗体Dx3860のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2,3,4,7,8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチドを含む請求項1に記載の組換抗体。

【請求項4】 モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2,3,4,7,8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチド、ならびに、モノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2,3,4,7,8-PeCDFに結合活性を有するポリペプチドを含む請求項1に記載の組換抗体。

【請求項5】 請求項1に記載の組換抗体のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項6】 請求項5に記載のDNAを含むクローニングまたは発現ベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のクローニングまたは発現ベクターで形質転換した形質転換体。

【請求項8】 請求項1に記載の組換抗体の製造方法であって、請求項7に記載の発現ベクターで形質転換した形質転換体を適当な培地中で培養し、該形質転換体または培地から組換抗体を回収することを含んでなる方法。

【請求項9】 2,3,4,7,8-PeCDFを免疫学的に捕獲する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

【請求項10】 2,3,4,7,8-PeCDFを免疫学的に測定する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン(2,3,4,7,8-Pe

CDF)に結合活性を有する新規な組換抗体、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、該遺伝子を導入したベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該組換抗体の製造方法、該組換抗体を用いる2,3,4,7,8-PeCDFの免疫学的捕獲法ならびに測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

内分泌攪乱物質による環境汚染が問題となり、その汚染状況の把握やヒトの健康への影響などの調査が進められている。これら内分泌攪乱物質によるヒトや環境への影響が明らかになるに従い、日本のみならず世界各国においても重大な社会的関心事となっている。なかでもダイオキシン類については、ヒトや生態系および環境への持続的な影響が懸念されおり、汚染状況の把握や、ヒトや生態系での暴露状況の調査、摂取ルートの解明、さらには汚染箇所のダイオキシン量のモニタリングや汚染除去方法への対応が急務となっている。ダイオキシン類は、有機塩素化合物の使用、生産、燃焼などの過程で生成することから発生源が多岐に渡るとともに、土壌、水質、大気、食品、海産物などにおいて広範な汚染が確認されている。従って、膨大な生体試料や環境試料などの試料中のダイオキシン濃度を測定し、対策を講じる必要から、ダイオキシン類の簡便かつ迅速な測定方法の確立が望まれている。

【0003】

ダイオキシン類には、75種類のポリクロロジベンゾダイオキシン(PCDD)および135種類のポリクロロジベンゾフラン(PCDF)からなる多数の構造異性体が存在する。最も毒性が高い2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)の毒性を1としたときの各ダイオキシン異性体の相対毒性が毒性等価指数として示されており、ダイオキシン類の分析においては毒性の高い7種類のPCDDおよび10種類のPCDFが測定対象物質とされている。また、内分泌攪乱物質の1つとして以前から問題とされていたポリクロロビフェニール(PCB)のうち12種類の共平面(co-planar)PCBもダイオキシン類として測定されるようになった。

【0004】

ダイオキシン類の測定は、従来、高分解能ガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー(HRGC/HRMS)分析により行われていた。しかし、HRGC/HRMS法は、試料中の妨害物質を除去するために多段階のクリーンアップ操作を必要とし、分析機器が高額であり、かつ測定者の習熟を要するため、特定の分析機関においてのみ測定が可能であった。ダイオキシン類の分析方法、特にHRGC/HRMS法においては、毒性の高い17種類のダイオキシン異性体の含有量を個々に定量し、次いで各異性体の実測値に毒性等価指数を乗じた値の総和を、2,3,7,8-TCDD相当量である毒性等量(TEQ)に換算し、この換算値をダイオキシン分析値として用いている。従って、データ解析を含め被検体の分析に多大な時間を要する。これらの理由から、ダイオキシン類のより簡便で安価かつ高感度な測定方法の開発が強く望まれている。

【0005】

また、特定の指標物質を測定することにより、より簡便にダイオキシン量(TEQ)を把握しようという考え方が根強く存在している。前駆体であるクロルベンゼンを測定する方法もこの1つである。近年、ダイオキシン異性体の1つである2,3,4,7,8-PeCDF量が、ダイオキシン類の総TEQと非常に高い相関性を有することが明らかになってきた(非特許文献1)。土壌、底質、大気、水質、排ガス、飛灰などの環境試料、母乳、血液などの生体試料、ならびに、海産物、食品などの広範な試料においても、2,3,4,7,8-PeCDFは、全ダイオキシンの主要構成成分であり、その含有量はダイオキシン類の総TEQと $R=0.96\sim0.99$ の高い相関を示す。従って、2,3,4,7,8-PeCDFは、ダイオキシン量を把握するための指標物質として注目されている。

【0006】

一方、抗体を利用してダイオキシン類を定量する試みも行われている。

例えば、特開2002-340882号公報(特許文献1)には、ダイオキシン類の捕集ユニット、抽出ユニット、分離精製ユニット、および抗体を用いてダイオキシン類を測定する測定ユニットの4つのユニットから構成されるダイオキシン類の測定装置および測定方法が記載されている。

また、特開2002-228660号公報(特許文献2)には、2,3,7,8-T

CDDに高親和性のモノクローナル抗体を作製し、これを用いてヒト血液や母乳などの生体試料中のダイオキシン類を検出する方法が記載されている。

さらに、特開 2002-119279 号公報(特許文献 3)には、ダイオキシン類である複数の異性体に対して交差反応性を有する数種の抗体を用い、ダイオキシン類の存在量を推定する方法が記載されている。

【0007】

しかし、これらの文献には、2,3,4,7,8-PeCDF を認識するモノクローナル抗体、ならびに、該モノクローナル抗体をコードする遺伝子配列、該遺伝子配列に基づく組換え抗体および該組換え抗体を用いる 2,3,4,7,8-PeCDF の測定方法については記載されていない。

また、これら文献の方法は、試料中に含まれるダイオキシン類の TEQ を把握するには至らないという欠点を有する。

【0008】

【非特許文献 1】

高菅ら、第 11 回環境化学討論会講演要旨集、p.136、2002 年

【特許文献 1】

特開 2002-340882 号公報

【特許文献 2】

特開 2002-228660 号公報

【特許文献 3】

特開 2002-119279 号公報

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、HRGC/HRMS 法で測定される 17 種類のダイオキシン類の主要構成成分であり、かつ、その含有量がダイオキシン類の総 TEQ と高い相関性を有する指標異性体である 2,3,4,7,8-PeCDF を、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定する方法を確立しようとした。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体を抗原として用いて、通常の細胞融合法により、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体を産生する2株のハイブリドーマ、即ち、モノクローナル抗体Dx3860を産生するハイブリドーマDx3860r1およびモノクローナル抗体Dx3150を産生するハイブリドーマDx3150r1を得た。

【0011】

また、本発明者らは、これらのハイブリドーマ中に含まれるmRNAを単離および精製し、このmRNAをもとにcDNAを合成した。次いで、このcDNAの中から、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域ならびにモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAを選択するため、抗体遺伝子特有の配列を利用してPCRを行い、目的の抗体遺伝子を特異的に増幅させた。これら選択されたcDNAの塩基配列を解析し、それがコードするアミノ酸配列を推定した。

【0012】

その結果、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号1および2で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号3および4で示されることがわかった。

また、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および6で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号7および8で示されることがわかった。

【0013】

さらに、本発明者らは、上記抗体の可変領域中の超可変領域(CDR1~3)のアミノ酸配列およびその位置を特定した。超可変領域のアミノ酸配列を以下の表1~4に示す。

【表 1】

表 1 : Dx3860 の H 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala	配列番号 9
CDR 2	Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr	配列番号 10
CDR 3	Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr	配列番号 11

【表 2】

表 2 : Dx3860 の L 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr	配列番号 12
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu	配列番号 13

【表 3】

表 3 : Dx3150 の H 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr	配列番号 14
CDR 2	Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn	配列番号 15
CDR 3	Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr	配列番号 16

【表 4】

表 4 : Dx3150 の L 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr	配列番号 17
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val	配列番号 18

【0014】

モノクローナル抗体D_x3860のH鎖およびL鎖可変領域中の超可変領域(CDR1～3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図1および図2に示す。また、モノクローナル抗体D_x3150のH鎖およびL鎖可変領域中の超可変領域(CDR1～3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図3および図4に示す。

【0015】

図1において、アミノ酸配列の26～33位がCDR1を、51～57位がCDR2を、96～103位がCDR3を示す。

図2において、アミノ酸配列の26～34位がCDR1を、52～54位がCDR2を、91～98位がCDR3を示す。

図3において、アミノ酸配列の26～34位がCDR1を、52～58位がCDR2を、97～107位がCDR3を示す。

図4において、アミノ酸配列の26～34位がCDR1を、52～54位がCDR2を、91～99位がCDR3を示す。

【0016】

また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードするDNAを発現ベクターに組み込み、該ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞において組換え抗体を発現させた。さらに、本発明者らは、該組換え抗体を用いて、試料中の2,3,4,7,8-PeCDFを定量しうることを確かめた。

【0017】

即ち、本発明は、2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン(2,3,4,7,8-PeCDF)に結合活性を有する組換え抗体であって、

(1)2,3,4,7,8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体D_x3860のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2)該モノクローナル抗体D_x3860のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(3)2,3,4,7,8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体D_x3150のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

ド；

(4) 該モノクローナル抗体 Dx3150 の L 鎖可変領域を構成し、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に 95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2,3,4,7,8-PeCDF に結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2,3,4,7,8-PeCDF に結合活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択される少なくとも 1 つのポリペプチドを含む組換抗体を提供するものである。

【0018】

また、本発明は、上記の組換抗体のアミノ酸配列をコードする DNA、該 DNA を含むクローニングまたは発現ベクター、該ベクターで形質転換した形質転換体、該形質転換体を用いて該組換抗体を製造する方法、ならびに、該組換抗体を用いて 2,3,4,7,8-PeCDF を免疫学的に捕獲および測定する方法を提供するものである。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明で言う「抗体」には、生体内に存在する天然型抗体の他に、抗体の H 鎖もしくは L 鎖の可変領域またはその組合せにより形成される、少なくとも 1 つの抗原結合部位を有するポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドには、例えば、H 鎖または L 鎖の可変領域のみを含むポリペプチド、1 組の H 鎖フラグメントと L 鎖からなる Fab フラグメント、2 組の H 鎖フラグメントと L 鎖からなる F(ab')₂ フラグメント、H 鎖可変領域と L 鎖可変領域がリンカーにより 1 本に結合された一本鎖組換抗体(scFv)などが含まれる。

【0020】

scFv には、例えば、N 末端側から「(H 鎖可変領域)-(リンカー)-(L 鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチド、および「(L 鎖可変領域)-(リンカー)-(H 鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチドが含まれる。リンカーは、sc

Fvが抗原に結合する際に、H鎖可変領域およびL鎖可変領域が効率良く折り畳まれるように、これらの領域の間に配置させるものである。このリンカーは、通常、5～15個のアミノ酸から構成されており、例えば、-(Gly₄Ser)₃-を例として挙げることができる。本発明において使用するリンカーは、上記目的を達成できる限り、アミノ酸の数および種類に制限はない。

【0021】

また、本発明の組換抗体においては、H鎖可変領域またはL鎖可変領域のN末端側およびC末端側に、さらに適当なアミノ酸配列が付加されていてもよい。例えば、以下の実施例において示すように、「(H鎖可変領域)-(リンカー)-(L鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、H鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、L鎖可変領域のC末端側にエピトープタグ配列を付加することができる。また、「(L鎖可変領域)-(リンカー)-(H鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、L鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、H鎖可変領域のC末端側にエピトープタグ配列を付加することができる。

【0022】

本発明の組換抗体には、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せにより形成される少なくとも1つの抗原結合部位を有するポリペプチドの他に、これらポリペプチドと実質的に同じ機能を有する変異ポリペプチドが含まれる。本発明で言う「実質的に同じ機能」とは、抗原に対する結合力が実質的に同じであることを意味する。即ち、配列番号5～8で示されるアミノ酸配列を有する本発明の抗2,3,4,7,8-PeCDF抗体のH鎖およびL鎖の可変領域は、抗原との結合力が実質的に同じである限り、1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換または付加変異を含むことができる。このような本発明の変異ポリペプチドは、配列番号5～8で示されるアミノ酸配列に対して、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。また、この変異は、図1～4に示される抗体可変領域中の超可変領域(CDR1～3)以外のフレームワークに存在するのが好ましい。

【0023】

また、本発明の組換抗体には、配列番号5～8で示されるポリペプチドのフラ

グメントであって、元のポリペプチドと実質的に同じ機能を有するフラグメント、ならびに、これらフラグメントの組合せにより形成されるポリペプチドが含まれる。これらのフラグメントは、図1～4に示される超可変領域(CDR1～3)の少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは3つ全てを含有する。

【0024】

本発明の組換え抗体は、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、該DNAを発現ベクターに組込み、該発現ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を適当な培地中で培養して該組換え抗体を発現させることにより製造することができる。

【0025】

所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、配列番号1～4(または図1～4)に示されるcDNA配列またはアミノ酸配列に基づいて、合成により調製することができる。別法によれば、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、次のようにして得ることもできる。即ち、本発明者らは、以下の実施例において示すように、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域、リンカー、Dx3860のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント(図5を参照)を組込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌Bに導入し、この大腸菌B(pET22Δ-Dx3860HL)を特許生物寄託センターに寄託した。さらに、本発明者らは、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域、リンカー、Dx3150のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント(図7を参照)を組込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌K-12に導入し、この大腸菌K-12(pET22Δ-Dx3150HL)を特許生物寄託センターに寄託した。所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、これらの発現ベクターから適当な制限酵素を用いて切出し、所望によりDNA配列中に変異を加えることにより得ることができる。また、DNAフラグメントの連結のために、常法によりフラグメントの末端を修飾することができる。

【0026】

得られたDNAフラグメントの発現ベクターへの組込みは、市販の発現ベク

ー[例えば、pE T-2 2b(+)など]の所定のフラグメント挿入部位に合致させるように、DNAフラグメントの末端を加工し、末端加工されたDNAフラグメントを発現ベクターに挿入することによって行うことができる。

【0027】

このようにして得た発現ベクターを、適当な宿主細胞、特に大腸菌[例えば、大腸菌B株、K-12株、BL21(DE3)株など]に導入し、挿入したDNAフラグメントの発現に適した培地で宿主細胞を培養することにより、所望の組換抗体を発現させることができる。発現された組換抗体を、常法により宿主細胞またはその培養液から回収することができる。回収した組換抗体は、例えばクロマトグラフィー法によって精製することができる。

この方法により、所望の組換抗体を、血清を必要とする培地で動物細胞を培養することにより得られるモノクローナル抗体より安価に、かつ大量に製造することができる。

【0028】

得られた組換抗体を用いて試料中の2,3,4,7,8-PeCDFを免疫学的に、迅速に捕獲することができる。このような捕獲法としては、イムノクロマトグラフィーや免疫沈降による2,3,4,7,8-PeCDFの分離、精製および濃縮方法が含まれる。また、このような2,3,4,7,8-PeCDFの捕獲作用を利用することにより、該組換抗体を用いて生体中に摂取されたダイオキシン類のうち主要物質である2,3,4,7,8-PeCDFを迅速に捕獲し、除去することも可能である。

【0029】

また、得られた組換抗体を用いて試料中の2,3,4,7,8-PeCDFを免疫学的に迅速かつ高感度に測定することができる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定(EIA)、蛍光免疫測定(FIA)などが含まれる。

また、免疫学的測定法は非競合法と競合法に大別される。本発明の組換抗体は競合法に用いるのが好ましい。この競合法には、間接競合法と直接競合法が含まれる。間接競合法においては、2,3,4,7,8-PeCDF誘導体を固定化し、試

料中の遊離 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF と固定化抗原との間で、組換抗体との反応を競合させる。直接競合法においては、組換抗体を固定化し、試料中の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の存在量に応じ、該組換抗体に結合する標識 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 誘導体の量を測定する。

【0030】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0031】

抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 抗体産生ハイブリドーマの調製

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、次のようにして調製した。即ち、初めに 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF にアルキル鎖を導入し、その末端を活性エステル体とした。次いで、これを、常法に従い、キャリアタンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA)に導入し、免疫用コンジュゲートを調製した。

この免疫用コンジュゲートを、アジュバント RAS R-700 (Ribi社)中に十分に乳化させ、この乳化液 200 μ l を BALB/c マウス(7週齢、雌)の腹腔内に投与して、マウスを免疫感作した。2週間毎に追加免疫を行い、追加免疫より約1週間の経過後に尾静脈より採血し、血中抗体価を競合 EIA 法により測定した。

【0032】

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF に対する高い抗体産生が確認されたマウスを選択し、尾静脈内に免疫用コンジュゲートを投与して、最終免疫を行った。最終免疫より3~4日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。対数増殖期にあるマウスミエローマ細胞(Sp2/O)と脾臓細胞を細胞数が1:5になるように混合し、ポリエチレングリコール法(PEG法)にて細胞融合を行った。10%FCS含有HAT培地に懸濁し、96ウェル培養プレートに分注(1~2.5 \times 10⁵/ウェル)し、37℃、5%CO₂下で培養した。

【0033】

培養開始より7～10日後、ハイブリドーマの増殖が見られたウエルの培養上清を一部採取し、2,3,4,7,8-PeCDF誘導体-BSAコンジュゲートを固相化したマイクロタイタープレートに添加した。室温で1時間反応させた後、0.05%Tween20含有PBS(-)で洗浄した。次いで、プレートにペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(γ 鎖認識)抗体(KPL社)を加えて室温で1時間反応させた後、同様にプレートを洗浄した。基質溶液(TMB基質、KPL社)を加えてプレート上のペルオキシダーゼ活性を測定し、培養上清中の抗体価を求めた。高い抗体価を示すウエルのうち、固相化2,3,4,7,8-PeCDF誘導体-BSAコンジュゲートに対する抗体価が、20%DMSOに溶解した2,3,4,7,8-PeCDFによって大きく阻害されるウエルを選抜し、該ウエル中のハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。クローニングにより単離された細胞を培養することによって、2,3,4,7,8-PeCDFを認識する2種類のモノクローナル抗体産生クローンを樹立した。

即ち、このようにして、モノクローナル抗体Dx3860を産生するハイブリドーマDx3860r1およびモノクローナル抗体Dx3150を産生するハイブリドーマDx3150r1を得た。

【0034】

mRNAの単離および精製

抗2,3,4,7,8-PeCDF抗体産生ハイブリドーマDx3860r1およびDx3150r1を、5%CO₂通気条件下、10%FCSを含有するRPMI 1640培地中で増殖させた。対数増殖期にある約 $2.8 \sim 5.0 \times 10^7$ 個の細胞から、AGPC法 [Chomczynski, P., Sacchi, N., Anal. Biochem., 162, p.156-159 (1987)] によって全RNAを抽出した。次いで、オリゴdTがラテックスビーズに結合したOrigotex-dT30 (宝酒造)を用いてpoly(A)+RNAを精製した。

【0035】

cDNAの合成

Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System (Amersham Pharmacia社)に含まれるPrimed first-strand reaction mixを用いて、上記のpoly(A)

+RNAからcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型とし、Mouse Ig-Primer Set (Novagen)およびTaq DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems社)を用いてPCRを行なった。Dx3860H鎖にはMuIgV_H5'-AとMuIgV_H3'-2のプライマーセットを、Dx3150H鎖にはMuIgV_H5'-DとMuIgV_H3'-2のプライマーセットを用いた。また、Dx3860L鎖およびDx3150L鎖の両方には、MuIgλV_L5'-AとMuIgλV_L3'-1のプライマーセットを用いた。用いたプライマーを以下の表5に示す。PCR反応は次のように行った。即ち、Dx3860H鎖とDx3150L鎖については、94℃×1分間、50℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを30サイクル行い、Dx3150H鎖については、94℃×1分間、60℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを30サイクル行い、Dx3860L鎖については、94℃×1分間、60℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを5サイクル行い、その後さらに、94℃×1分間、50℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを30サイクル行った。

【0036】

【表5】

表5：cDNA合成用PCRプライマー

H鎖 5'側			
Dx3860	MuIgV _H 5'-A	GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTTT	(配列番号19)
Dx3150	MuIgV _H 5'-D	ACTAGTCGACATGGRCAGRCTTACWYYTCATTCCT	(配列番号20)
		ACTAGTCGACATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT	(配列番号21)
		ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	(配列番号22)
H鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)			
	MuIgV _H 3'-2	CCCAAGCTTCCAGGRCARKGGATARACIGRTGG	(配列番号23)
L鎖 5'側 (Dx3860、Dx3150共通)			
	MuIgλV _L 5'-A	GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	(配列番号24)
L鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)			
	MuIgλV _L 3'-1	CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGAIGGYGGRAA	(配列番号25)

【0037】

cDNAのサブクローニング

上記のPCR産物を、TAクローニングキットであるpGEM-T Easy Vector System I (Promega社)を用いてpGEM-T Easyに挿入した後、大腸菌XL1-Blueを形質転換した。コンピテントセルとして、XL1-Blue Competent Cells (STRATAGENE社)を使用した。

【0038】

塩基配列の決定とアミノ酸配列の解析

pGEM-T Easyにサブクローニングした抗体遺伝子cDNAクローンについて、T7プライマー(5'-TAATACGACTCACTATAGGG: 配列番号26)を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems社)によるシーケンス反応を行った。次いで、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)にて配列を解析した。その結果、Dx3860抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号1および2)ならびにDx3150抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号3および4)を得た。塩基配列の解析ならびにアミノ酸配列の推定および解析には、解析ソフトDNAsis(日立ソフトエンジニアリング)を使用した。

【0039】

また、配列番号1~4の配列中に含まれる超可変領域は、ImMunoGeneTicsデータベース(<http://imgt.cines.fr>)の分類に従って特定した。このデータベースは、Lefranc, M.-P.ら[Nucleic Acids Research, 27, p.209-212 (1999)]、Ruiz, M.ら[Nucleic Acids Research, 28, p.219-221 (2000)]、および、Lefranc, M.-P. [Nucleic Acids Research, 29, p.207-209 (2001)]の論文を参照して作成されている。特定した超可変領域(CDR1~3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、図1~4に示す。

【0040】

発現ベクターpET22Δの作製

市販ベクターであるpET-22b(+)(Novagen社)の制限酵素サイトXbaI-Nc

oI 間の配列を、市販ベクターである pE T-3 d (Novagen 社) の制限酵素サイト XbaI-NcoI 間の配列に置換して、T7/lac プロモーター、ヒスチジntag および T7 ターミネーターを有する発現ベクター pE T 2 2 Δ を作製した。この発現ベクター pE T 2 2 Δ を、制限酵素 NcoI (New England BioLabs 社) と NotI (東洋紡社) で切断し、その末端を Calf intestine Alkaline Phosphatase (東洋紡社) により脱リン酸化処理した。0.7% アガロースゲル電気泳動により、切断した pE T 2 2 Δ のバンドを分離し、ゲルを切り出し、MagExtractor PCR & Gel Clean Up (東洋紡社) を用いて DNA をゲルより抽出した。この NcoI-NotI サイトに、以下のように scFv フラグメントを組み込み、これを scFv 発現ベクターとした。

【0041】

cDNA からの scFv フラグメントの作製

クローニングした抗体遺伝子の H 鎖および L 鎖の cDNA を、リンカー配列をコードする DNA により連結し、これを発現ベクターに組み込むために、制限酵素配列を含むプライマーを用いて、H 鎖および L 鎖の cDNA を PCR で増幅した。Dx3150 H 鎖は、BamHI サイトの配列を GGATCC から GGATTC に変更し、かつ、BamHI サイトの前後の配列を含むようにプライマーを設計し、H 鎖 DNA を 5' 側と 3' 側の 2 つに分け増幅した。リンカー DNA は、fill-in により H 鎖および L 鎖の cDNA を連結するために、これらの配列の一部を含むプライマーにより PCR で増幅した。これによって、一本鎖抗体のアミノ末端側が H 鎖となるものには、H 鎖センス DNA 3' 端側の配列をリンカー DNA の 5' 端側に、L 鎖センス DNA 5' 端側の配列をリンカー DNA の 3' 端側に付加した。また、一本鎖抗体のアミノ末端側が L 鎖となるものには、L 鎖センス DNA 3' 端側の配列をリンカー DNA の 5' 端側に、H 鎖センス DNA 5' 端側の配列をリンカー DNA の 3' 端側に付加した。H 鎖、L 鎖およびリンカー DNA の増幅に用いたプライマーの組合せを表 6 および表 7 に示す。

【0042】

【表 6】

表 6 : scFv構築用PCRプライマー

<u>リンカー用オリゴ(センス)</u>		
GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC		(配列番号27)
<u>Dx3860 HL</u>		
・H鎖		
3860H 5' (Nco)	G ACC ATG GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GG	(配列番号28)
3860H 3' (Mro)	CC TCC GGA AGA GAC AGT GAC CAG GGT ACC TTG GC	(配列番号29)
・L鎖		
3860L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号30)
3860L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT	(配列番号31)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3860H)	GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号32)
リンカー 3' (3860L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号33)
<u>Dx3860 LH</u>		
・L鎖		
3860L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号34)
3860L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT TCC TCC	(配列番号35)
・H鎖		
3860H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GG	(配列番号36)
3860H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	(配列番号37)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3860L)	ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号38)
リンカー 3' (3860H)	CCC GGA CTC CAC CAG CTT CAC TTC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号39)

【0043】

【表 7】

表 7 : scFv構築用PCRプライマー(続き)

<u>Dx3150 HL</u>		
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Nco)	G ACC ATG GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CC	(配列番号40)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号41)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号42)
3150H 3' (Mro)	CC TCC GGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT ACC TTG GC	(配列番号43)
・L鎖		
3150L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号44)
3150L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT	(配列番号45)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150H)	GGT ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号46)
リンカー 3' (3150L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号47)
<u>Dx3150 LH</u>		
・L鎖		
3150L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号48)
3150L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT TCC TCC	(配列番号49)
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GG	(配列番号50)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号51)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号52)
3150H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	(配列番号53)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150L)	ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号54)
リンカー 3' (3150H)	TCC TGA CTC CTG AAG CTG TAC ATC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号55)

【0044】

PCR増幅を、GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems社)を使用し、rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて、次のように行った。即ち、94℃×1分間、58℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94℃×1分間、48℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを20サイクル行った。PCR増幅の後、各PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動により分離した。DNAフラグメントを含むゲルを切り出し、MagExtractor PCR & Gel Clean Up-(東洋紡社)を用いてDNAをゲルから抽出した。次いで、抽

出したH鎖、L鎖およびリンカーDNAの3種類のDNAを混合し、rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて94℃×1.5分、65℃×3分の反応サイクルを20サイクル行うか、あるいは、Pfu DNAポリメラーゼ(STRATAGENE社)を用いて95℃×1.5分、65℃×6分の反応サイクルを20サイクル行うことにより、H鎖、L鎖およびリンカーDNAを連結した。

【0045】

このように連結したscFvフラグメントを、それがコードするアミノ酸配列と共に、図5～8(配列番号56～59;アミノ酸配列のみは配列番号60～63)に示した。

図5(配列番号56)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域、リンカー、Dx3860のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3860HL)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～114位はH鎖可変領域を、115～129位はリンカーを、130～239位はL鎖可変領域を示す。

図6(配列番号57)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域、リンカー、Dx3860のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3860LH)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～110位はL鎖可変領域を、112～126位はリンカーを、127～240位はH鎖可変領域を示す。

図7(配列番号58)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域、リンカー、Dx3150のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3150HL)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～118位はH鎖可変領域を、119～133位はリンカーを、134～243位はL鎖可変領域を示す。

図8(配列番号59)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域、リンカー、Dx3150のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3150LH)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1～110位はL鎖可変領域を、112～126位はリンカーを、127～244位はH鎖可変領域を示す。

【0046】

さらに、得られたscFvフラグメントを増幅するために、反応溶液にscFvの両端(Nco I-Not I)に対応するプライマーを加えてPCRを行った。Dx3860については、94℃×1分、67℃×1分、72℃×2分の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94℃×1分、60℃×1分、72℃×2分の反応サイクルを20サイクル行った。Dx3150については、95℃×1分、62℃×1分、75℃×4分の反応サイクルを5サイクル行い、さらに95℃×1分、55℃×1分、75℃×4分の反応サイクルを20サイクル行った。PCR産物を、1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、scFvのDNAフラグメント(730~740bp)を含むゲルを切り出し、DNAフラグメントをゲルから抽出した。次いで、このDNAフラグメントの末端を、制限酵素Nco I (New England Bio Labs社)およびNot I (東洋紡社)により処理し、再度MagExtractorにより精製した。

【0047】

scFv DNAフラグメントを、発現ベクターpET22ΔのNco I-Not Iサイトに挿入し、この発現ベクターで大腸菌XL1-Blueを形質転換した。ライゲーションにはDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社)を用い、コンピテントセルとしてXL1-Blue Competent Cells(STRATAGENE社)を使用した。サブクローニングしたクローンについて、scFv部分の配列を解析し、正しい配列を有するクローンを選択してscFvの発現に用いた。このようにして、scFvフラグメントDx3860HLを含む発現ベクターpET22Δ-Dx3860HLならびにscFvフラグメントDx3150HLを含む発現ベクターpET22Δ-Dx3150HLを得た。

【0048】

発現ベクターpET22Δ-Dx3860HLは、大腸菌Bに導入し、大腸菌B(pET22Δ-Dx3860HL)として、また、発現ベクターpET22Δ-Dx3150HLは、大腸菌K-12に導入し、大腸菌K-12(pET22Δ-Dx3150HL)として、平成15年2月27日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、それぞれ受託番号FERM BP-8305および

びFERM BP-8306を取得した。

【0049】

大腸菌での発現

scFvフラグメントDx3860HLが組込まれた発現ベクターpET22Δ-Dx3860HLで形質転換した大腸菌 Origami B(DE3)(Novagen社)を、LB培地300ml中、OD600が約0.5になるまで37℃で培養した。次いで、培養温度を25℃に下げて培養を続けた。OD600が約1.0になった時点で、IPTG(イソプロピルチオガラクトシド)を終濃度が1mMになるように添加し、終夜培養して、scFvの発現を誘導した。遠心により菌体約1gを回収した後、50mM Tris-HCl(pH8.0)、0.1M NaCl中に懸濁し、リゾチーム(終濃度0.2mg/ml)およびTriton X-100(終濃度1%)を加えて溶菌した。遠心(15,000xg、20分間)により沈殿を回収し、沈殿を1.0% Triton X-100を含む緩衝液で2回洗浄し、scFvを含む沈殿を約100mg得た。

【0050】

scFvの再構成

封入体として得られたscFvを、25mM PB、350mM NaCl、6Mグアニジン・HCl(pH7.4)の緩衝液中加入し、4℃で終夜静置して溶解した。遠心(10,000xg、15分間)により残渣を除去した後、上記の緩衝液にて平衡化したニッケルキレートカラム(Qiagen社)に適用した。カラム容積の約5~10倍量の緩衝液にてカラムを十分に洗浄した後、20%グリセロールおよび400mMアルギニンを含む上記緩衝液に交換した。6Mから0Mまでのグアニジン・HClのグラジエントを用いて、キレートカラム上に結合したscFvを再構成させた。25mM PB、350mM NaCl、20%グリセロール、50mMイミダゾールの溶液(pH7.4)でカラムを洗浄した後、イミダゾール濃度を300mMに上げてscFvを溶出させた。

【0051】

抗2,3,4,7,8-PeCDF scFvを用いた間接競合イムノアッセイによる2,3,4,7,8-PeCDFの測定

マイクロタイタープレートに2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体-B S Aコンジュゲート($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) $50 \mu\text{l}$ を加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20含有PBS(-)でマイクロタイタープレートの各ウェルを洗浄し、ブロックエース(雪印社)を加え、室温で2時間静置してブロッキングを行った。マイクロタイタープレートを洗浄後、各濃度に調製した2, 3, 4, 7, 8-PeCDF (20% DMSO溶液) $25 \mu\text{l}$ と抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFvの溶液 $25 \mu\text{l}$ を添加し、室温で0.5~1時間反応させた。再度マイクロタイタープレートを洗浄した後、2000倍希釈した抗tetra-His抗体(Qiagen社)を加え、室温で1時間反応させた。次いで、3000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(γ 鎖認識)抗体(KPL社) $50 \mu\text{l}$ を添加し、室温で1時間反応させた。マイクロタイタープレートの各ウェルを十分に洗浄して未反応液を除去した後、基質溶液(TMB基質、KPL社)を加え、室温で15分間静置した。 $50 \mu\text{l}$ の1M H_3PO_4 を添加して反応を停止させ、プレートリーダー(Labsystems社)によりOD450(対照: OD600)を測定した。この結果を図9にグラフで示す。このグラフから、抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFvにより、高感度に2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを測定できることが明らかである。

【0052】

H鎖可変領域ポリペプチドの2, 3, 4, 7, 8-PeCDF結合活性の確認

発現ベクターpET22 Δ -Dx3860HLのL鎖可変領域を含む制限酵素サイトBamHI-NotI間の配列を除去して作製した発現ベクターpET22 Δ -Dx3860Hを用いて大腸菌Origami B(DE3)(Novagen社)を形質転換した。この形質転換体を用いて、scFvと同様に、H鎖可変領域ポリペプチド(配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド)の発現を行なった。

封入体として得られたH鎖可変領域ポリペプチドを、上記と同様に、ニッケルキレートカラム上で再構成した後、イミダゾールを用いて単離および精製した。キレートカラムより溶出された画分について、吸光度(280nm)を測定してタンパク質濃度を求め、さらに、EIA法により固相化した2, 3, 4, 7, 8-PeCDF-B S Aコンジュゲートへの反応性を検討した。この結果、図10に示すように、H鎖可変領域ポリペプチド画分に抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF活性を認め

、H鎖可変領域ポリペプチドが2,3,4,7,8-PeCDFに結合活性を有することを確認した。

【0053】

【発明の効果】

本発明により提供されるDNAを用いて宿主細胞内で発現させることにより、2,3,4,7,8-PeCDFを認識する組換抗体を大量に製造することができる。このように製造された組換抗体は、親モノクローナル抗体より安価であり、それを用いて2,3,4,7,8-PeCDFを免疫学的に捕獲することができ、免疫測定に応用することができる。また、変異を導入したDNAを用いることにより、さらに有利な特性を有する組換抗体、例えば、2,3,4,7,8-PeCDFへの親和性が向上した組換抗体や安定性が改善された組換抗体などを製造することができ、生体成分である天然の抗体タンパク質が有する問題点の克服も可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd.

<120> Recombinant antibody recognizing dioxin
and gene encoding said antibody

<130> 188226

<160> 63

<210> 1

<211> 342

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Inventor: Sawadaishi, Kazuyuki

Inventor: Higano, Keiichi

Inventor: Kataoka, Chiwa

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 1

gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc 144

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

gca tcc ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag 192

Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg 240

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu

65 70 75 80

caa atg acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca 288

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

aga ggc tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc 336
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

tct gca 342
 Ser Ala

<210> 2

<211> 330

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of L-chain variable region of
 monoclonal antibody Dx 3860

<400> 2

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act ctt 96
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu
 20 25 30

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac 288
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc 330
 His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of H-chain variable region of
 monoclonal antibody Dx 3150

<400> 3

gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag 48
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

tct ctg tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc	96
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly	
20 25 30	
ttt tac tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg	144
Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp	
35 40 45	
atg ggc tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc	192
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu	
50 55 60	
aaa aat cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc	240
Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe	
65 70 75 80	
ctg aag ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt	288
Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gta agt tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggc acc	336
Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
act ctc aca gtc tcc tca	354
Thr Leu Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 4

<211> 330

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 4

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu

1

5

10

15

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act agt 96

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20

25

30

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

35

40

45

cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50

55

60

tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65

70

75

80

cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct ctt tgg tac aac acc 288

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr

85

90

95

cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act gtc cta ggc 330

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly

100

105

110

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 5

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100

105

110

Ser Ala

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 6

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu

1

5

10

15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu

20

25

30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 7

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20

25

30

Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35

40

45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu

50

55

60

Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe

65

70

75

80

Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85

90

95

Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide of L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 8

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr
85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 1 in H-chain variable region of

monoclonal antibody Dx 3860

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 2 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 10

Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr

1

5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 3 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 11

Ala Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 1 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 12

Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr

1

5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 3 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 13

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 1 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 14

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr

1

5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 2 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 15

Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn

1

5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 3 in H-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 16

Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 1 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 17

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 3 in L-chain variable region of
monoclonal antibody Dx 3150

<400> 18

Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val

1

5

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

gggaattcat grasttskgg ytmrctkgr ttt

33

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

actagtcgac atggrcagrc ttacwtyytc attcct

36

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

actagtcgac atgatggtgt taagtcttct gtacct

36

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

actagtcgac atgggatgga gctratatcat sytctt

36

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified base

<222> (30)..(30)

<223> i

<400> 23

cccaagcttc cagggrccar kggataracn grtgg

35

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

gggaattcat ggcctggayt ycwctywtmy tct

33

<210> 25

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified base

<222> (24)..(24)

<223> i

<400> 25

cccaagctta gctcytcwgw gganggyggr aa

32

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

taatacgact cactataggg

20

<210> 27

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 27

ggaggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcc

45

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

gaccatggaa gtgaagctgg tggagtccgg ggg

33

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

cctccggaag agacagtgac cagggtacct tggc

34

<210> 30

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

gcggatccca ggctgttgtg actcaggaat ct

32

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

gagcggccgc gcctaggaca gtcagtttgg t

31

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

ggtaccctgg tcactgtctc ttccggagga ggcggttcag

40

<210> 33

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

agattcctga gtcacaacag cctgggatcc gccaccgcca g

41

<210> 34

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

gaccatggcc caggctgttg tgactcagga atct

34

<210> 35

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

cctccggagc ctaggacagt cagtttggtt cctcc

35

<210> 36

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

gcggatccga agtgaagctg gtggagtccg ggggagg

37

<210> 37

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

gagcggccgc tgcagagaca gtgaccagag t

31

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

accaaactga ctgtcctagg ctccggagga ggcggttcag

40

<210> 39

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

cccgactcc accagcttca cttcgatcc gccaccgcca g

41

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

gaccatggat gtacagcttc aggagtcagg acc

33

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

cctggaaact gccgaatcca gttccagt

28

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

actggaactg gattcggcag tttccagg

28

<210> 43

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

cctccggagg agactgtgag agtggtacct tggc

34

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

gcggatccca ggctgttgtg actcaggaat ct

32

<210> 45

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

gagcggccgc gcctaggaca gtcagtctgg t

31

<210> 46

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

ggtaccactc tcacagtctc ctccggagga ggcggttcag

40

<210> 47

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

agattcctga gtcacaacag cctgggatcc gccaccgcca g

41

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48

gaccatggcc caggctgttg tgactcagga atct

34

<210> 49

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 49

cctccggagc ctaggacagt cagtctgggt cctcc

35

<210> 50

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 50

gcggatccga tgtacagctt caggagtcag gacctgg

37

<210> 51

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 51

cctggaaact gccgaatcca gttccagt

28

<210> 52

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 52

actggaactg gattcggcag tttccagg

28

<210> 53

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 53

gagcggccgc tgaggagact gtgagagtgg t

31

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 54

accagactga ctgtcctagg ctccggagga ggcggttcag

40

<210> 55

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 55

tcctgactcc tgaagctgta catcggatcc gccaccgcca g

41

<210> 56

<211> 717

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> scFv fragment Dx3860HL

<400> 56

gaa gtg aag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca tcc ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag 192
 Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg 240
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

caa atg acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca 288
 Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

aga ggc tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggt acc ctg gtc act gtc 336
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

tct tcc gga gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga 384
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt 432
 Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly
 130 135 140

gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act 480
 Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 145 150 155 160

ctt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act 528
 Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr
 165 170 175

ggt cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga 576
 Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190

ttc tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg 624
 Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly
 195 200 205

gca cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc 672
 Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
 210 215 220

aac cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc 717
 Asn His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235

<210> 57

<211> 720

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> scFv fragment Dx3860LH

<400> 57

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu

1

5

10

15

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act ctt 96

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu

20

25

30

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

35

40

45

cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50

55

60

tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65

70

75

80

cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac 288

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85

90

95

cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc tcc gga 336

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
 100 105 110

gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gaa gtg 384
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 115 120 125

aag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg tcc ctg 432
 Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu
 130 135 140

aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat gcc atg 480
 Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
 145 150 155 160

tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc gca tcc 528
 Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser
 165 170 175

ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag ggc cga 576
 Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190

ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg caa atg 624
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met
 195 200 205

acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca aga ggc 672
 Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly

210

215

220

tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 720
 Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 225 230 235 240

<210> 58

<211> 729

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> scFv fragment Dx3150HL

<400> 58

gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag 48
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

tct ctg tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc 96
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

ttt tac tgg aac tgg att cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg 144
 Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

atg ggc tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc 192
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu

50

55

60

aaa aat cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc 240
Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

ctg aag ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt 288
Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gta agt tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggt acc 336
Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

act ctc aca gtc tcc tcc gga gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct 384
Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

ggc ggt ggc gga tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc 432
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr
130 135 140

aca tca cct ggt gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg 480
Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly
145 150 155 160

gct gtt aca act agt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat 528
Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp
165 170 175

cat tta ttc act ggt cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt 576
His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly

180

185

190

gtt cct gcc aga ttc tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc 624
Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu

195

200

205

acc atc aca ggg gca cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct 672
Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala

210

215

220

ctt tgg tac aac acc cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act 720
Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr

225

230

235

240

gtc cta ggc

729

Val Leu Gly

<210> 59

<211> 732

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> scFv fragment Dx3150LH

<400> 59

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act agt 96
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct ctt tgg tac aac acc 288
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr
 85 90 95
 cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act gtc cta ggc tcc gga 336
 His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
 100 105 110
 gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gat gta 384

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 115 120 125

cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag tct ctg 432
 Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu
 130 135 140

tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc ttt tac 480
 Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr
 145 150 155 160

tgg aac tgg att cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg atg ggc 528
 Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly
 165 170 175

tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc aaa aat 576
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Asn
 180 185 190

cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc ctg aag 624
 Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe Leu Lys
 195 200 205

ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt gta agt 672
 Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser
 210 215 220

tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc 720
 Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

225 230 235 240

aca gtc tcc tca

732

Thr Val Ser Ser

<210> 60

<211> 239

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3860HL

<400> 60

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

... Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val ...

35 40 45

Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly
130 135 140

Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
145 150 155 160

Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr
165 170 175

Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
180 185 190

Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205

Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
210 215 220

Asn His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230 235

<210> 61

<211> 240

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3860LH

<400> 61

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly

100

105

110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

115

120

125

Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu

130

135

140

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

145

150

155

160

Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser

165

170

175

Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg

180

185

190

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met

195

200

205

Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly

210

215

220

Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

225

230

235

240

<210> 62

<211> 243

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3150HL

<400> 62

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr
130 135 140

Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly
145 150 155 160

Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp
165 170 175

His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly
180 185 190

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu
195 200 205

Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala
210 215 220

Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Gly

<210> 63

<211> 244

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3150LH

<400> 63

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr
85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
115 120 125

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu

130

135

140

Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr

145

150

155

160

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly

165

170

175

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Asn

180

185

190

Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe Leu Lys

195

200

205

Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser

210

215

220

Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

225

230

235

240

Thr Val Ser Ser

【図面の簡単な説明】

【図 1】 モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す配列図である。

【図 2】 モノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す配列図である。

【図 3】 モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す配列図である。

【図 4】 モノクローナル抗体 Dx3150 の L 鎖可変領域の DNA 配列、アミノ酸配列および超可変領域 (CDR 1~3) の位置を示す配列図である。

【図 5】 scFv フラグメント Dx3860HL の構成図である。

【図 6】 scFv フラグメント Dx3860LH の構成図である。

【図 7】 scFv フラグメント Dx3150HL の構成図である。

【図 8】 scFv フラグメント Dx3150LH の構成図である。

【図 9】 抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF scFv を用いた間接競合イムノアッセイにより、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を測定した結果を示すグラフである。

【図 10】 H 鎖可変領域ポリペプチド画分と抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 活性の関係を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】

Dx3860 VH

1	GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG OCT GGA GGG TOC CTG AAA CTC	60
1	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu	20
61	TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCC ATG TCT TGG GTT OGC CAG ACT	120
21	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr	40
	-----CDR1-IMGT-----	
121	OCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TOC TTT AGT AAT GGT GGT ATC ACC TAC TAT CCA	180
41	Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro	60
	-----CDR2-IMGT-----	
181	GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TOC AGA GAT AAT GCC AGG AAC ATC CTG TAC CTG	240
61	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu	80
241	CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT	300
81	Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly	100
	-----CDR3-IMGT-----	
301	OCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	342
101	Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	114

【図 2】

Dx3860 VL

1	CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA OCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC	60
1	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu	20
61	ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA	120
21	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu	40
	-----CDR1-IMGT-----	
121	AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT	180
41	Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val	60
	-----CDR2-IMGT-----	
181	OCT GCC AGA TTC TCA GGC TOC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA	240
61	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	80
241	CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC	300
81	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu Val Phe	100
	-----CDR3-IMGT-----	
301	GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC	330
101	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	110

【図 3】

Dx3150 VII

1	GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA OCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT CTG TCT CTC	60
1	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu	20
61	ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGC TTT TAC TGG AAC TGG ATC OGG CAG	120
21	Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln	40
	-----CDR1-IMGT-----	
121	TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC ATA AGC TAC GAC GGT TAC AAT AAT TAC	180
41	Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr	60
	-----CDR2-IMGT-----	
181	AAC CCA TTT CTC AAA AAT CGA GTG TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT GAG AAC CAG TTT TTC	240
61	Asn Pro Phe Leu Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe	80
241	CTG AAG TTG CAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCT ACA TAT TAC TGT GTA AGT TAC GGT	300
81	Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser Tyr Gly	100
301	AGT CGG AGG GGA GTT ACC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA	354
101	Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	118
	-----CDR3-IMGT-----	

【図 4】

Dx3150 VL

1	CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA OCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC	60
1	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu	20
61	ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA	120
21	Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu	40
	-----CDR1-IMGT-----	
121	AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT	180
41	Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val	60
	-----CDR2-IMGT-----	
181	OCT GCC AGA TTC TCT GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA	240
61	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	80
241	CAG ACT GAG GAT GAG GCG ATA TAT TTC TGT GCT CTT TGG TAC AAC ACC CAT TTG GTG TTC	300
81	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe	100
	-----CDR3-IMGT-----	
301	GGT GGA GGA ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC	330
101	Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly	110

【図 5】

D x 3860 H L sc Fv

```

1  GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60
  CTT CAC TTC GAC CAC CTC AGG CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG GAC TTT GAG
1  Glu-Val-Lys-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu 20
  VR →

61 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT 120
  AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA AGG ATA CGG TAC AGA ACC CAA GCG GTC TGA
21 Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala-Met-Ser-Trp-Val-Arg-Gln-Thr 40

121 CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GGT ATC ACC TAC TAT CCA 180
  GGT CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT AGG AAA TCA TTA CCA CCA TAG TGG ATG ATA GGT
41 Pro-Glu-Lys-Arg-Leu-Glu-Trp-Val-Ala-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr-Tyr-Tyr-Pro 60

181 GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT AAT GCC AGG AAC ATC CTG TAC CTG 240
  CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCT CTA TTA CGG TCC TTG TAG GAC ATG GAC
61 Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ala-Arg-Asn-Ile-Leu-Tyr-Leu 80

241 CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT 300
  GTT TAC TGG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGC CGG TAA ATA ATG ACA CGT TCT CCG ATA CCA
81 Gln-Met-Thr-Ser-Leu-Arg-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-Ile-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly 100

301 CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCC GGA GGA GGC GGT TCA GGC 360
  GGA CGA ATG ACC CCG GTT CCA TGG GAC CAG TGA CAG AGA AGG CCT CCT CCG CCA AGT CCG
101 Pro-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser 120

361 GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC 420
  CCT CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCT AGG GTC CGA CAA CAC TGA GTC CTT AGA CGT GAG TGG
121 Gly-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser 140
  Linker
  VL →

421 ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT 480
  TGT AGT GGA CCA CTT TGT CAG TGT GAG TGA ACA GCG AGT TCA TGA CCC CGA CAA TGT TGA
141 Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr 160

481 CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT 540
  GAA TTG ATA CGG TTG ACC CAG GTT CTT TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA
161 Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu-Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly 180

541 AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC 600
  TTA TGG TTG TTG GCT CGA GGT CCA CAA GGA CGG TCT AAG AGT CCG AGG GAC TAA CCT CTG
181 Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp 200

601 AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT 660
  TTC CGA CGG GAG TGG TAG TGT CCC CGT GTC TGA CTC CTA CTC CGT TAT ATA AAG ACA CGA
201 Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala 220

661 CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC 717
  GAT ACC ATG TCG TTG GTA AAC CAC AAG CCA CCT CCT TGG TTT GAC TGA CAG GAT CCG
221 Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu-Val-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu-Gly 239

```

【図 6】

D x 3860 L H scFv

```

1 CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60
  GTC CGA CAA CAC TGA GTC CTT AGA CGT GAG TGG TGT AGT GGA CCA CTT TGT CAG TGT GAG
1 Gln-Ala-Val-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu 20
  VL →
61 ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT CTT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA 120
  TGA ACA GCG AGT TCA TGA CCC CGA CAA TGT TGA GAA TTG ATA CGG TTG ACC CAG GTT CTT
21 Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu 40

121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT 180
  TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTG TTG GCT CGA GGT CCA CAA
41 Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val 60

181 CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240
  GGA CGG TCT AAG AGT CCG AGG GAC TAA CCT CTG TTC CGA CGG GAG TGG TAG TGT CCC CGT
61 Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTG TTC 300
  GTC TGA CTC CTA CTC CGT TAT ATA AAG ACA CGA GAT ACC ATG TCG TTG GTA AAC CAC AAG
81 Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu-Val-Phe 100

301 GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC 360
  CCA CCT CCT TGG TTT GAC TGA CAG GAT CCG AGG CCT CCT CCG CCA AGT CCG CCT CCA CCG
101 Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly 120
  Linker
361 TCT GGC GGT GGC GGA TCC GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT 420
  AGA CCG CCA CCG CCT AGG CTT CAC TTC GAC CAC CTC AGG CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA
121 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Glu-Val-Lys-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro 140
  VII →
421 GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT GCC ATG 480
  CCT CCC AGG GAC TTT GAG AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA AGG ATA CGG TAC
141 Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu-Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala-Met 160

481 TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT 540
  AGA ACC CAA GCG GTC TGA GGT CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT AGG AAA TCA TTA CCA
161 Ser-Trp-Val-Arg-Gln-Thr-Pro-Glu-Lys-Arg-Leu-Glu-Trp-Val-Ala-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly 180

541 GGT ATC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT AAT GCC 600
  CCA TAG TGG ATG ATA GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCT CTA TTA CCG
181 Gly-Ile-Thr-Tyr-Tyr-Pro-Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ala 200

601 AGG AAC ATC CTG TAC CTG CAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAT TAC 660
  TCC TTG TAG GAC ATG GAC GTT TAC TGG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGC CGG TAA ATA ATG
201 Arg-Asn-Ile-Leu-Tyr-Leu-Gln-Met-Thr-Ser-Leu-Arg-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-Ile-Tyr-Tyr 220

661 TGT GCA AGA GGC TAT GGT CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 720
  ACA CGT TCT CCG ATA CCA GGA CGA ATG ACC CCG GTT CCC TGA GAC CAG TGA CAG AGA CGT
221 Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ala 240

```

【図7】

D x3150HL scFv

```

1  GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT CTG TCT CTC   60
  CTA CAT GTC GAA GTC CTC AGT CCT GGA CCG GAG CAC TTT GGA AGA GTC AGA GAC AGA GAG
1  Asp-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Leu   20
  VH→
61 ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGC TTT TAC TGG AAC TGG ATT CGG CAG   120
  TGG ACA AGA CAG TGA CCG ATG AGG TAG TGG TCA CCG AAA ATG ACC TTG ACC TAA GCC GTC
21 Thr-Cys-Ser-Val-Thr-Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr-Trp-Asn-Trp-Ile-Arg-Gln   40

121 TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC ATA AGC TAC GAC GGT TAC AAT AAT TAC   180
  AAA GGT CTT TTG TTT GAC CTT ACC TAC CCG ATG TAT TCG ATG CTG CCA ATG TTA TTA ATG
41 Phe-Pro-Gly-Asn-Lys-Leu-Glu-Trp-Met-Gly-Tyr-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn-Asn-Tyr   60

181 AAC CCA TTT CTC AAA AAT CGA GTG TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT GAG AAC CAG TTT TTC   240
  TTG GGT AAA GAG TTT TTA GCT CAC AGG TAG TGA GCA CTG TGT AGA CTC TTG GTC AAA AAG
61 Asn-Pro-Phe-Leu-Lys-Asn-Arg-Val-Ser-Ile-Thr-Arg-Asp-Thr-Ser-Glu-Asn-Gln-Phe-Phe   80

241 CTG AAG TTG CAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCT ACA TAT TAC TGT GTA AGT TAC GGT   300
  GAC TTC AAC GTA AGA CAC TGA TGA CTC CTG TGT TAT TCG ATG ACA CAT TCA ATG CCA
81 Leu-Lys-Leu-His-Ser-Val-Thr-Thr-Glu-Asp-Thr-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Val-Ser-Tyr-Gly   100

301 AGT CGG AGG GGA GTT ACC TAC TGG GGC CAA GGT ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA   360
  TCA GCC TCC CCT CAA TGG ATG ACC CCG GTT CCA TGG TGA GAG TGT CAG AGG AGG CCT CCT
101 Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-Gly-Gly   120

361 GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA   420
  CCG CCA AGT CCG CCT CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCT AGG GTC CGA CAA CAC TGA GTC CTT
121 Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gln-Ala-Val-Val-Thr-Gln-Glu   140
  Linker
421 TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG   480
  AGA CGT GAG TGG TGT AGT GGA CCA CTT TGT CAG TGT GAG TGA ACA GCG AGT TCA TGA CCC
141 Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly   160

481 GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT   540
  CGA CAA TGT TGA TCA TTG ATA CGG TTG ACC CAG GTT CTT TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA
161 Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu-Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr   180

541 GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCT GGC TCC   600
  CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTG TTG GCT CGA GGT CCA CAA GGA CCG TCT AAG AGA CCG AGG
181 Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser   200

601 CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA CAG ACT GAG GAT GAG GCG ATA   660
  GAC TAA CCT CTG TTC CGA CCG GAG TGG TAG TGT CCC CGT GTC TGA CTC CTA CTC CGC TAT
201 Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile   220

661 TAT TTC TGT GCT CTT TGG TAC AAC ACC CAT TTG GTG TTC GGT GGA GGA ACC AGA CTG ACT   720
  ATA AAG ACA CGA GAA ACC ATG TTG TGG GTA AAC CAC AAG CCA CCT CCT TGG TCT GAC TGA
221 Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Arg-Leu-Thr   240

721 GTC CTA GGC   729
  CAG GAT CCG
241 Val-Leu-Gly   243

```

【図 8】

D x 3150 LH spFv

```

1  CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60
   GTC CGA CAA CAC TGA GTC CTT AGA CGT GAG TGG TGT AGT GGA CCA CTT TGT CAG TGT GAG
1  Gln-Ala-Val-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu 20
   VL →

61  ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA 120
   TGA ACA CGC AGT TCA TGA CCC CGA CAA TGT TGA TCA TTG ATA CGG TTG ACC CAG GTT CTT
21  Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Glu 40

121 AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CGA GCT CCA GGT GTT 180
   TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA TTA TGG TTG TTG GCT CGA GGT CCA CAA
41  Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val 60

181 CCT GCC AGA TTC TCT GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240
   GGA CGG TCT AAG AGA CCG AGG GAC TAA CCT CTG TTC CGA CGG GAG TGG TAG TGT CCC CGT
61  Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GCG ATA TAT TTC TGT GCT CTT TGG TAC AAC ACC CAT TTG GTG TTC 300
   GTC TGA CTC CTA CTC GCG TAT ATA AAG ACA CGA GAA ACC ATG TTG TGG GTA AAC CAC AAG
81  Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile-Tyr-Phe-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val-Phe 100

301 GGT GGA GGA ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC 360
   CCA CCT CCT TGG TCT GAC TGA CAG GAT CCG AGG CCT CCT CCG CCA AGT CCG CCT CCA CCG
101 Gly-Gly-Gly-Thr-Arg-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly 120
   Linker

361 TCT GGC GGT GGC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT 420
   AGA CCG CCA CCG CCT AGG CTA CAT GTC GAA GTC CTC AGT CCT GGA CCG GAG CAC TTT GGA
121 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Asp-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-Lys-Pro 140
   VH →

421 TCT CAG TCT CTG TCT CTC ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGC TTT TAC 480
   AGA GTC AGA GAC AGA GAG TGG ACA AGA CAG TGA CCG ATG AGG TAG TGG TCA CCG AAA ATG
141 Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Cys-Ser-Val-Thr-Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr 160

481 TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC ATA AGC TAC 540
   ACC TTG ACC TAA GCC GTC AAA GGT CCT TTG TTT GAC CTT ACC TAC CCG ATG TAT TCG ATG
161 Trp-Asn-Trp-Ile-Arg-Gln-Phe-Pro-Gly-Asn-Lys-Leu-Glu-Trp-Met-Gly-Tyr-Ile-Ser-Tyr 180

541 GAC GGT TAC AAT AAT TAC AAC CCA TTT CTC AAA AAT CGA GTG TCC ATC ACT CGT GAC ACA 600
   CTG CCA ATG TTA TTA ATG TTG GGT AAA GAG TTT TTA GCT CAC AGG TAG TGA GCA CTG TGT
181 Asp-Gly-Tyr-Asn-Asn-Tyr-Asn-Pro-Phe-Leu-Lys-Asn-Arg-Val-Ser-Ile-Thr-Arg-Asp-Thr 200

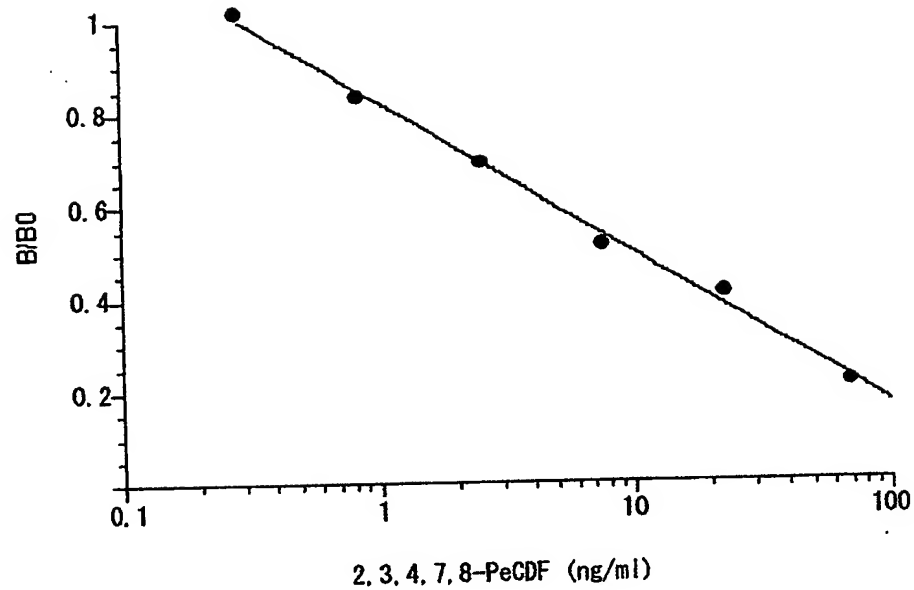
601 TCT GAG AAC CAG TTT TTC CTG AAG TTG CAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCT ACA TAT 660
   AGA CTC TTG GTC AAA AAG GAC TTC AAC GTA AGA CAC TGA TGA CTC CTG TGT CGA TGT ATA
201 Ser-Glu-Asn-Gln-Phe-Phe-Leu-Lys-Leu-His-Ser-Val-Thr-Thr-Glu-Asp-Thr-Ala-Thr-Tyr 220

661 TAC TGT GTA AGT TAC GGT AGT CGG AGG GGA GTT ACC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC 720
   ATG ACA CAT TCA ATG CCA TCA GCC TCC CCT CAA TGG ATG ACC CCG GTT CCG TGG TGA GAG
221 Tyr-Cys-Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu 240

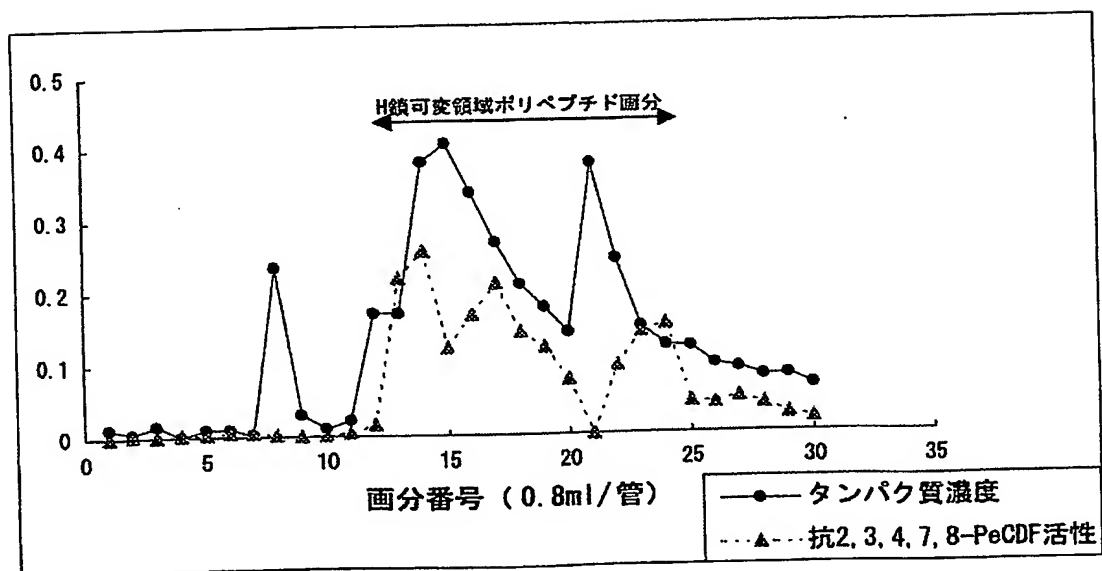
721 ACA GTC TCC TCA 732
   TGT CAG AGG AGT
241 Thr-Val-Ser-Ser 244

```


【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ダイオキシン類、特に 2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-PeCDF)を、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定する方法を確立する。

【解決手段】 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識する本発明の新規な組換抗体を使用することにより上記課題が解決される。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 9 1 6 6 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 6 1 9 3 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町 6 8

氏 名

京都電子工業株式会社